

## POJAVA NOVIH OBOLJENJA RIBA NA PODRUČJU SRBIJE

SVETLANA JEREMIĆ, VLADIMIR RADOSAVLJEVIĆ

*Naučni institut za veterinarstvo Srbije, Vojvode Toze 14, 11000 Beograd, Srbija*

### OUTBREAK OF NEW FISH DISEASES IN SERBIA

#### *Abstract*

For both aquaculture production and restocking or enhancement of wild stocks, there is a substantial international trade in live fish and eyed eggs. The major reasons for this international trade are: year-round egg availability, the availability of improved fish-stocks through selective breeding, lack of conditions for egg production, market expansion by breeders and egg producers. Unfortunately, this is one of major routes for spread of diseases. During last two years, several diseases were diagnosed for the first time in Serbia: EHN, IPN, RMS, *Janthinobacterium lividum* caused disease of rainbow trout, and Rhabdovirus carpio was isolated from rainbow trout. Based on presented facts, it is possible to conclude that present control measures are inadequate, and we can expect further increase of disease outbreaks.

**Key words:** *fish diseases, EHN, IPN, RMS*

#### UVOD

Iako je uočljiv ubrzani razvoj akvakulture, ona se još uvek suočava sa problemima koji mogu uticati na njenu održivost. Zarazne bolesti izazvane virusima, bakterijama i parazitima predstavljaju stalnu pretnju, pa se sa intenziviranjem akvakulture očekuje i proporcionalno povećanje učestalosti pojave bolesti. Iako lokalni patogeni, neodgovarajuća tehnologija gajenja, faktori životne sredine i loš kvalitet vode nastavljaju biti najčešći uzrok pojave oboljenja kod uzgajanih riba, transfer patogena pri međunarodnoj trgovini živim ribama i njihovim produktima predstavlja skriveni uzrok mnogih velikih epizootija.

U svrhu zdravstvene zaštite riba, na teritoriji Republike Srbije se vrši kontinuirano kliničko praćenje zdravstvenog stanja i laboratorijska dijagnostika bolesti riba, u skladu sa Zakonom o zdravstvenoj zaštiti životinja RS i podzakonskim aktima.

Autori ovog rada su prateći epizootiološku situaciju, pojavljivanje i rasprostranjenost zaraznih bolesti riba tokom prethodne dve godine utvrdili pojavu novih bolesti

u ribnjačkim populacijama riba na teritoriji Republike Srbije: utvrđena je pojava epizootske hematopoezne nekroze (EHN), zarazne nekroze gušterače (ZNG), sindroma crvenih pega (RMS), oboljenja kalifornijske pastrmke izazvanog sa *Janthinobacter lividum*, i izolovan je *Rhabdovirus carpio* iz kalifornijske pastrmke. Iako je ZNG dijagnostikovao prvi i jedini put dijagnostikovao 1989. kod uvezene kalifornijske pastrmke, njegova pojava nakon gotovo dve decenije se može smatrati novom, tim pre što je oboljenje utvrđeno u daleko većem obimu.

## MATERIJAL I METODE

Bakteriološka ispitivanja obavljena su zasejavanjem iz promenjenih unutrašnjih organa, kože i škrge na standardne i specifične hranljive podloge. Nakon 48<sup>h</sup> izvršen je pregled kolonija na oblik, boju, granulisanost, mukožnost, hrapavost i hemolitičnost. Determinacija izolovanih bakterija izvršena je na osnovu morfoloških i biohemijskih karakteristika.

Kao materijal za izolaciju virusa koristili smo škrge i parenhimatozne organe koji su pripremljeni za virusološka ispitivanja standardnom metodom. Ukratko, pulirani parenhimatozni organi i škrge su homogenizovani sa MEM-om i centrifugirani na 2500 x g, 20 minuta. Za izolaciju, supernatanti su inokulirani na 24 sata stare kulture EPC, FHM, RTG-2 i BF-2 ćelijskih linija. Inokulisane kulture su inkubirane na 15 - 20°C, tokom 7 dana i svakodnevno ih posmatrali na pojavu citopatogenog efekta. Identifikacija virusa je vršena PCR, ELISA testom i testom fluorescentnih antitela.

## REZULTATI I DISKUSIJA

U toku dvogodišnjeg ispitivanja utvrđena su sledeća oboljenja:

1. **Zarazna nekroza gušterače (ZNG/IPN)** - akutno, infektivno, veoma kontagiozno oboljenje pastrmskih riba koje se klinički manifestuje u prvih 20 nedelja od početka ishrane, naglom pojavom uginuća (10-90%), pri čemu mortalitet zavisi od više faktora, kao što su soj virusa (M c A l l i s t e r and O w e n s, 1995), domaćin i uslovi sredine (D o b o s and R o b e r t s, 1983). Uzročnik oboljenja je Aquabirnavirus, iz familije Birnaviridae (D o b o s and R o b e r t s, 1983). Najvažniji izvor zaraze su bolesne ribe i one koje ostaju doživotne kliconoše nakon što prebole infekciju. Kliconoše virus izlučuju fecesom i polnim produktima. Otkrivanje takvih nosilaca je važan podatak za kontrolu bolesti, jer se virus pored horizontalnog, prenosi i vertikalnim putem, preko ikre (A h n e et al. 1989; A h n e and N e g e l e, 1985; D o r s o n and T o r c h y, 1985), a površinska dezinfekcija ikre nije u potpunosti efikasna u preveniranju ovog načina prenošenja (B u l l o c k et al. 1976). Zbog šteta koje nastaju u proizvodnji pastrmki i vetikalnog prenošenja, Međunarodni ured za epizootije (OIE) i Zakon o veterinarstvu Republike Srbije su uvrstili ZNG na listu bolesti obaveznih za prijavljivanje.

Oboljenje je u Srbiji prvi put utvrđeno 1989. godine i nije se javljalo sve do 2007. godine, kada je bolest utvrđena na jednom pastrmskom ribnjaku u mačvanskom okrugu, kod obolele mlađi kalifornijske pastrmke, poreklom od oplodene ikre uvezene iz SAD. Već 2008. godine oboljenje je dijagnostikovano na tri pastrmska ribnjaka u Zlatiborskom, Mačvanskom i Pirotskom okrugu, kod obolele ovogodišnje i jednogodišnje pastrmske mlađi. U svim slučajevima se radilo o klinički manifestnom oboljenju sa visokim mortalitetom mlađi kalifornijske pastrmke. Obolela mlađ je pokazivala znake po-

remećaja plivanja na karakterističan, grčevit, spiralan i vrtložni način, praćen periodima u toku kojih je mirovala na dnu bazena, u stanju iscrpljenosti. Kod obolelih riba zapažena je tamna pigmentisanost tela, otečenost abdominalne regije i umeren egzoftalmus. U trbušnoj šupljini prisutna crvena serozna tečnost. Jetra i slezina su blede boje, a žučni mehur proširen. Želudac i creva su bez hrane ispunjeni velikom količinom sluzavog sadržaja. Za izolaciju virusa korišćene su RTG-2, EPC, FHM ćelijske kulture stare 24<sup>h</sup>. Inokulisane kulture su inkubirane na 15°C tokom 7 dana i svakodnevno posmatrane na pojavu citopatogenog efekta (CPE). Nakon pojave CPE vršena je identifikacija virusa ELISA testom i testom indirektno imunofluorescencije (IFAT). RT-PCR je dokazano prisustvo nukleinske kiseline virusa zarazne nekroze gušterače.

**2. Epizootska hematopoezna nekroza (EHN)** - akutno virusno oboljenje grgeča, kalifornijske pastrmke, soma i iktalurida izazvano Iridovirusima iz roda Ranavirus. Bolest izazivaju tri slična virusa: virus hematopoezne nekroze (EHNV), virus evropskog soma (ESV) i virus američkog somića (ECV). Bolest se karakteriše hemoragijama, edemima i nekrotičnim promenama jetre, slezine i hematopoeznog tkiva bubrega. Epizootska hematopoezna nekroza je prvi put dokazana kod grgeča (*Perca fluviatilis*) 1986. godine u Australiji (L a n g d o n and H u m p h r e y, 1987). Nakon pojave bolesti izazvane sa EHNV u Australiji 1986. godine, epizootska hematopoezna nekroza je utvrđena u Francuskoj kod *Ictalurus melas* (P o z e t et al. 1992), u Nemačkoj kod *Silurus glanis* (A h n e et al. 1990; A h n e et al. 1989), Danskoj (B l o c h and L a r s e n, 1993) i Finskoj (A r i e l et al. 1999; T a p i o v a a r a et al. 1998). Oboljenje se javlja kod svih starosnih kategorija riba. Pored grgeča oboljeva kalifornijska pastrmka, somovi i američki somić. Šaranske vrste riba nisu osjetljive na EHN virus. Zbog šteta koje nastaju u proizvodnji riba, Međunarodni ured za epizootije (OIE) je uvrstio EHN na listu opasnih bolesti obaveznih za prijavljivanje. U 2008. godini je utvrđen visok mortalitet jednogodišnje i dvogodišnje mlađi američkog somića na jednom šaranskom ribnjaku u letnjem periodu. Uginuća američkog somića su započela sredinom avgusta meseca kada su spoljašnje temperature iznosile od 30 do 36°C, a temperature vode oko 28°C. Uginuće je trajalo do sredine septembra meseca. Tom prilikom uginulo je oko 6 tona američkog somića. Nije bilo uginuća šarana. Za laboratorijska ispitivanja uzeto je 20 primeraka jednogodišnje i dvogodišnje mlađi američkog somića sa sledećim kliničkim simptomima: uvećanje abdomena, bledilo škrga, tačkasta i difuzna krvarenja po ventralnom delu trbuha, petehijalna krvarenja po perajima, prolabiran i zacrvenjen anus. Takođe iz istog jezera uzeto je 10 primeraka dvogodišnje mlađi šarana bez ikakvih kliničkih simptoma bolesti. Za izolaciju virusa korišćene su EPC i FHM ćelijske kulture stare 24 časa. Inokulisane kulture su inkubirane na 20°C, tokom 7 dana i svakodnevno posmatrane na pojavu citopatogenog efekta (CPE). Nakon 48<sup>h</sup> je došlo do pojave CPE, a PCR sa specifičnim prajmerima dokazano je prisustvo nukleinske kiseline ECV virusa. Ovo je prvi objavljeni slučaj pojave epizootske hematopoezne nekroze u Srbiji i prva izolacija ECV iz američkog somića.

### 3. Oboljenje kalifornijske pastrmke izazvano sa *Janthinobacterium lividum*

*Janthinobacterium lividum* je gram-negativna štapićasta bakterija, pripadnik familije *Oxalobacteraceae*. Tipične i atipične forme *J. lividum* se smatraju normalnom mikroflorom vode i tla (S n e a t h, 1984). Međutim, poznato je nekoliko slučajeva pojave oboljenja kalifornijske pastrmke izazvanog ovom bakterijom, sa mortalitetom oko 30%

(A u s t i n et al. 1992, A u s t i n et al. 2003), a zabeleženi su i slučajevi infekcije ljudi sa smrtnim ishodom (P a t i j a n a s o o n t o r n et al., 1992).

Tokom decembra 2007., na jednom pastrmskom ribnjaku je utvrđeno povećano uginuće jednomesečne mlađi kalifornijske pastrmke (oko 20%), težine 0,5-1,0 g, sa letargijom, ishemijom škrge, tamnijom pigmentacijom kože i uvećanjem abdomena. Patoloanatomskim pregledom je utvrđen otok bubrega, ishemija jetre i slezine, a u trbušnoj šupljini je bila prisutna umerena količina prozirne tečnosti.

Homogenati bubrega, jetre i slezine jednomesečne mlađi kalifornijske pastrmke su zasejani na krvni agar, Miler-Hinton agar, triptoza soja agar, Rimler-Shotts agar, KDM-2. Inkubacija je vršena u aerobnim uslovima na temperaturi od 20°C. Nakon 72<sup>h</sup> je uočeno prisustvo želatinoznih, ljubičastih kolonija. Na osnovu morfoloških, fizioloških i biohemijskih karakteristika izolovana bakterija je identifikovana kao *Janthinobacterium lividum*. Ovo je prvi slučaj pojave oboljenja kalifornijske pastrmke izazvanog sa *Janthinobacterium lividum* u Srbiji.

**4. Sindrom crvenih pega kalifornijske pastrmke** - Sindrom crvenih pega (red mark syndrome, RMS) je subhronično, nefatalno zapaljensko kožno oboljenje kalifornijske pastrmke (V e r n e r –J e f f r e y s et al. 2006). Morbiditet je do 80%, a oboljenje zahvata ribe veličine od 15 cm dužine do matičnih primeraka (P o n d, 2007). Do uginuća kao posledice ovog sindroma ne dolazi, ali prisustvo kožnih lezija rezultira nižom kategorizacijom ili odbacivanjem riba u prometu. Rezultati istraživanja ukazuju da je stanje infektivne etiologije, ali uzročnik nije definitivno dokazan (F e r g u s o n et al. 2006; V e r n e r –J e f f r e y s et al., 2008). Tokom maja 2008. godine na jednom ribnjaku je utvrđena pojava RMS kod kalifornijske pastrmke dužine 15-20 cm koja je uvezena nakoliko meseci ranije iz Bosne i Hercegovine. Na obolelim primercima je uočeno prisustvo crvenih, jasno ograničenih, ulceroznih lezija po koži, prečnika oko 3 cm ili veće. Patohistološki je utvrđen fokalni negnojni dermatitis sa jakom limfocitnom infiltracijom. Uprkos sveobuhvatnim parazitološkim, bakteriološkim, mikološkim, virusološkim analizama, potencijalni etiološki agens nije izolovan iz obolelih riba. Tri nedelje nakon antibiotske terapije, klinički simptomi RMS su nestali. Ovo je prvi slučaj pojave sindroma crvenih pega u Srbiji.

**5. Infekcija kalifornijske pastrmke sa *Rhabdovirus carpio*** - *Rhabdovirus carpio* je uzročnik prolećne viremije šarana. Šaran je najvažnija ugrožena vrsta u svim starosnim kategorijama, iako oboljevaju i druge ciprinidne vrste riba.

U januaru 2008. godine kod jednomesečne mlađi kalifornijske pastrmke poreklom od uvezene oplođene ikre, kod koje je primećen povećan mortalitet bez kliničkih simptoma bolesti, i kod jednogodišnje mlađi koja je poticala iz uvoza izolovan je i identifikovan virus prolećne viremije šarana. Za izolaciju virusa su korišćene FHM (*fathead minnow*) i EPC (*epithelioma papulosum cyprini*) ćelijske linije, a identifikacija je vršena PCR, ELISA testom i testom indirektno imunofluorescencije (IFAT).

## ZAKLJUČCI

Zarazne bolesti predstavljaju stalnu opasnost pri gajenju riba. Klinički su manifestne i eksplozivnog toka, tako da je njihovo učešće u patologiji i ekonomičnosti proizvodnje od izuzetnog značaja. Njihovo štetno delovanje ispoljava se u povećanom morbiditetu

i mortalitetu, slabljenju organizma riba, smanjenom prirastu, slabijem iskorišćavanju hrane i nedostatku nasadnog materijala. Pojava većeg broja oboljenja koja se ranije nisu javljala upozorava da mere koje se preduzimaju u cilju zaštite zdravstvenog stanja riba nisu dovoljne. S obzirom da većina novoutvrđenih oboljenja izaziva visok mortalitet, potrebno je uložiti dodatni napor u cilju održanja zdravstvenog statusa ribnjačkih populacija kroz primenu efikasnih biosigurnosnih mera, i to prvenstveno pri kupovini oplodene ikre i mladi izvan Srbije.

### **Zahvalnica:**

Ovaj rad je rezultat projekta koji je finansirao od strane Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije (TR. 20047).

### **LITERATURA**

Ahne, W., Jorgensen, P.E.V., Olesen, N.J., Fischer-Scherl, T. and Hoffmann, R. (1989). Aquatic Birnaviruses: virus of the serogroup II isolated from an IPN outbreak in brook trout (*Salvelinus fontinalis*). Bull. Eur. Ass. Fish Pathol., 9, 14-16.

Ahne, W. & Negele, R.D. (1985). Studies on transmission of infectious pancreatic necrosis virus via eyed eggs and sexual products of salmonid fish. In: Fish and Shellfish Pathology, Ellis A.E., ed. Academic Press, London, UK, 261-269.

Ahne, W., Ogawa, M. and Schlotfeldt H.J. (1990). Fish viruses: transmission and pathogenicity of an icosahedral cytoplasmic deoxyribovirus isolated from sheatfish *Silurus glanis*. J. Vet. Med. [B], 37, 187-190.

Ahne, W., Schlotfeldt, H.J. and Thomsen, I. (1989). Fish viruses: isolation of an icosahedral cytoplasmic deoxyribovirus from sheatfish (*Silurus glanis*). J. Vet. Med. [B], 36, 333-336.

Bullock, G.L., Rucker, R.R., Amend, D., Wold, K. and Stuckey, H.M. (1976). Infectious pancreatic necrosis: transmission with iodine-treated and non-treated eggs of brook trout (*Salvelinus fontinalis*). J. Fish. Res. Board Can., 33, 1197-1198.

Ariel, E., Tapiovaara, H. and Olesen, N.J. (1999). Comparison of Pike-perch (*Stizostedion lucioperca*), Cod (*Gadus morhua*) and turbot (*Scophthalmus maximus*) iridovirus isolates with reference to other piscine and amphibian iridovirus isolates. European Association of Fish Pathologists, VIII. International Conference on Diseases of Fish and Shellfish, Rhodes, Greece, 20-24 September.

Austin, B., Gonzalez, C.J., Stobie, M., Curry J.I. and McLoughlin M.F. (1992). Recovery of *Janthinobacterium lividum* from diseased rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), in Northern Ireland and Scotland. Journal of Fish Diseases 15, 357-359.

Austin, D. A., Jordan, E. M. and Austin, B. (2003). Recovery of an unusual Gram-negative bacterium from ulcerated rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), in Scotland Journal of Fish Diseases, 26, 247-249.

Bloch, B. and Larsen, J.L. (1993). An iridovirus-like agent associated with systemic infection in cultured turbot *Scophthalmus maximus* fry in Denmark. Dis. Aquat. Org., 15, 235-240.

Dorson, M. and Torchy C. (1985). Experimental transmission of infectious pancreatic necrosis virus via the sexual products. In: Fish and Shellfish Pathology, Ellis A.E., ed. Academic Press, London, UK, 251-260.



Dobos, P. and Roberts, T.E. (1983). The molecular biology of infectious pancreatic necrosis virus: a review. *Can. J. Gen. Microbiol.*, 29, 377-384.

Langdon, J.S. and Humphrey, J.D. (1987). Epizootic Hematopoietic Necrosis a New Viral Disease in Redfin Perch *Perca fluviatilis* L. in Australia. *J. Fish Dis.*, 10, 289-298.

Ferguson, H. W., Girons, A., Rizgalla, G., Lapatra, S., Branson, E.J., Mackenzie, K., Davies, M., Collins, R.O., Diab, A., and Crumlish, M. (2006). Strawberry disease in rainbow trout in Scotland: pathology and association with *Flavobacterium psychrophilum*. *Vet Rec.* 158: 630 - 631.

McAllister P.E. & Owens W.J. (1995). Assessment of the virulence of fish and molluscan isolates of infectious pancreatic necrosis virus for salmonid fish by challenge of brook trout, *Salvelinus fontinalis* (Mitchill). *J. Fish. Dis.*, 18, 97-103.

Patijanasoontorn B, Boonma P, Wilailackana C, Sitthikesorn J, Lumbiganon P, Chetchotisakd P, Noppawinyoowong C, Simajareuk K. (1992). Hospital acquired *Janthiobacterium lividum* septicemia in Srinagarind Hospital. *J Med Assoc Thai*;75 Suppl 2:6-10

Pond, M. (2007). Red Mark Syndrome/Cold Water Strawberry Disease. *Finfish News*, 3, 27-28.

Pozet, F., Morand, M., Moussa, A., Torhy, C. and De Kinkelin, P. (1992). Isolation and preliminary characterization of a pathogenic icosahedral deoxyribovirus from the catfish (*Ictalurus melas*). *Dis. Aquat. Org.*, 14, 35-42.

Tapiovaara, H., Olesen, N.J., Linden, J., Rimaila-Parnanen, C.-H. (1998). Isolation of an iridovirus from pikeperch (*Stizostedion lucioperca*). *Dis. Aquat. Org.*, 32, 185-193.

Sneath, P. H. A. (1984). Genus *Janthinobacterium* De Ley. Segers and Gillis 1978. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 1 (ed. by N. R. Krieg & J. G. Holt), pp. 376-377. Williams & Wilkins. Baltimore. MD.

Verner-Jeffreys, D., Algoet, M., Feist, S., Bateman, K., Peeler, E., Branson (2006). Studies on Red Mark Syndrome. *Finfish News*, 19-22.

Verner-Jeffreys, D.W., Pond, M.J., Peeler, E.J., Rimmer, G.S., Oidtmann, B., Way, K., Mewett, J., Jeffrey, K., Bateman, K., and Reese, R.A. (2008). Emergence of cold water strawberry disease of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* in England and Wales: outbreak investigations and transmission studies. *Diseases of aquatic organisms* 79(3):207.